

Fenolok és aromás ligninszármazékok biológiai oxidációjának vizsgálata

GULYÁS FERENC

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest

A lignin molekula a mineralizáció folyamán aromás alapegységeire szakad szét. HENDERSON [10] aromás alapegységek fölszabadulását figyelte meg a fűrészponton növekvő gombák tenyészeiben. BÖRNER [2, 3] megállapításai szerint a lignint tartalmazó növényi szerves anyag talajban történő lebontása során is fölszabadulnak aromás vegyületek, mint pl.: ferulasav, vanillin és vanillinsav. A talaj metoxifenoljait és fenilpropánjait egyes gombák és sugárgombák sőt baktériumok is egyedüli szénforrásként képesek hasznosítani. Ebben az esetben a fokozatos oxidáció a benzolgyűrű felszakadásához vezet és nyíltszénláncú vegyületek keletkeznek. HENDERSON [11] vizsgálatai szerint a fenolaldehidek és fenilpropánok gombák által történő lebontása során aromás karbonsavak képződnek, amelyek további oxidációjának eredményeképpen protokatehusav képződik. A benzolgyűrű fölszakadása a protokatehusavnál következik be és nyíltszénláncú vegyület, a β -keto-adipinsav képződik. DAGLEY és munkatársai [5] rámutatnak arra, hogy az aromás vegyületek baktériumok által történő lebontása során a β -keto-adipinsavból ecetsav és borostyánkősav keletkezik. Ebben az esetben a benzolgyűrű a 3. és 4. számú szénatom között szakad fel. Ezzel szemben a 4–5. típusú oxidáz reakció esetében oxiecetsav és tejsav képződik.

E folyamatokkal sok esetben párhuzamosan az aromás vegyületek másik típusú — talajbiológiai szempontból nem kevésbé fontos — oxidatív átalakulása is végbemegy, amely kinonvegyületek képződéséhez vezet. E folyamatban a lakkáz néven ismert polifenoloxidáznak tulajdonítják a legfontosabb szerepet. A gombák között nagy számban találhatók lakkázt szintetizáló szervezetek. LYR [20], BOIDIN [1], FÁHRAEUS [7], FÁHRAEUS és LJUNGGREN [8] több mint száz gombánál mutattak ki extra és intracelluláris lakkáz fermenteket. KÜSTER [17] és SEVČIK [21] kromogén *STREPTOMYCES* törzseknél is tapasztalt polifenoloxidáz aktivitást.

TROJANOWSKI és MATWIJOV [22] lengyel kutatóknak a lakkázaktivitást talajviszonyok között is sikerült kimutatni. Véleményük szerint a talaj lakkáz típusú polifenoloxidázai a talajban növekvő gombák extracelluláris produktumainak tekinthetők. WIERINGA [23] fontos szerepet tulajdonít a talaj-mikroszervezetek által szintetizált polifenoloxidázoknak a humuszképződés folyamataiban. Vizsgálatai szerint egyes spórás baktériumok és sugárgombák aromás vegyületeket tartalmazó tápközegben sötét színű, humuszhoz hasonló anyagot képeznek. Úgy véli, hogy az aromás vegyületekből kinon, illetve kinon típusú vegyületek képződnek, amelyek polimerizálódhatnak, s ez utóbbiak a mikroorganizmusok nitrogéntartalmú anyagcsere termékeivel kölcsönhatásba lépve huminszerű anyaggá alakulhatnak.

Az aromás vegyületek teljes szétbontása, valamint a polifenoloxidázok által katalizált kinon típusú átalakulás az aromás ligninszármazékok biológiai transzformációjának két különböző oldata. E két folyamat — talaj közegben — szoros kapcsolatban van egymással és a környezeti viszonyoktól függően eltérő intenzitással megy végbe.

Kísérleti rész

Munkánk során tanulmányoztuk a mikroszkopikus gombák növekedését aromás ligninszármazékokon. Kvalitatív fenoloxidáz teszt vizsgálatokat végeztünk a mikroszkopikus gombák fenoloxidáz fermentjeinek kimutatása céljából. Dializált enzim kivonatok felhasználásával vizsgáltuk a gombák lakkázaktivitását, a lakkázszintézisre serkentően ható környezeti tényezőket valamint a lakkázaktivitás változását a reakcióközeg pH-jának függvényében.

19 mikroszkopikus gombával tanulmányoztuk az aromás ligninszármazékokon való növekedésük mértékét. A kísérletekben egy fenilpropán (ferulasav), valamint a p-oxibenzaldehid, vanillin, sziringaldehid, (mely utóbbiak a lignin lúgos nitrobenzollal történő oxidációjának termékei) voltak a kísérleti objektumok.

A vizsgálat céljára HENDERSON és FARMER [14] által ismertetett folyékony, ásványi összetételű tápközeget alkalmaztunk. A fenolanyagokat külön-külön desztillált vízben oldottuk fel 0,02%-os mennyiségben. Az ásványi sókat tartalmazó alaptápközeget autoklávozással, a fenolos oldatokat pedig hideg úton — filtrálással — sterilizáltuk. Steril 50 ml-es Erlenmeyer lombikokba 5 ml ásványi sókat tartalmazó tápközeget és 5 ml fenololdatot adagoltunk. A fenolanyagtartalom minden aromás vegyület esetében 1000 μg -volt lombikenként. A beoltást oly módon végeztük, hogy a gombákat burgonya-dextróz agaron előinkubáltuk, majd a gombatelepekből kivágott 8 mm átmérőjű agarlemez darabkákat, steril körülmények között a lombikokba helyeztük. Az inkubáció 26 °C-os termosztátban 28 napon át tartott. Az inkubáció befejeztével a tápoldatot a micéliumtól és az agarlemez darabkáktól szűréssel elválasztottuk, desztillált vízzel átmostuk és a térfogatot 20 ml-re kiegészítettük. A visszamaradt fenolanyag mennyiségeket U. V. abszorpciós méréssel határoztuk meg. Ezzel párhuzamosan az aromás vegyületek lebontása során képződő átmeneti bomlástermékeket (a megfelelő aromás karbonsavakat) is kimutattuk. Ezek p-oxibenzaldehid esetében a p-oxibenzoésav, vanillint ill. ferulasavat tartalmazó közegben a vanillinsav, valamint a sziringaldehid savszármazéka a sziringasav voltak. Az analízist LEMON [18] által kidolgozott módszer szerint folytattuk le, azaz a fenolaldehidek és aromás karbonsavak mennyiségét savas és lúgos oldatban leolvasott abszorpciós maximumok alapján mértük oly módon, hogy a leolvasási értékeket a megfelelő hígítású standard oldatok mérési adataiból elkészített görbékhez viszonyítottuk. A kísérleti eredményeket az 1. táblázatban ismertetjük.

Az előzőekben részletesen ismertetett kísérlet metodikájával teljesen megegyezően vizsgálatokat végeztünk annak tisztázására, hogy az aromás ligninszármazékok lebontását — az inkubáció egyes időszakasaiban — milyen értékek jellemzik. A tanulmányozott gombaszervezetek: *Fusarium avenaceum* var. *herbarum* (L—6) és *Nigrospora* sp. voltak. A vizsgált aromás vegyületek, mint az előző kísérletben: p-oxibenzoésav, vanillin, ferulasav és sziringaldehid. A négy ismétléssel beállított kísérlet egy-egy mintájában a visszamaradt

1. táblázat

Aromás ligninszármazékok elbontása mikroszkopikus gombák által.
Inkubációs idő 28 nap. (Bevitt mennyiség 1000 µg/lombik)

| (1) A vizsgált Chaetomiumok | (2) Vanillin | | (3) p-oxitenzaldehid | | (4) Ferulasav | | (5) Szingingaldehid | |
|--------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------------|---|-------------------|------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| | vissza- maradt | vanillin- sav képző- dött | vissza- maradt | p-oxi- benzo- sav képző- dött | vissza- maradt | vanillin- sav képző- dött | vissza- maradt | szingin- sav képző- dött |
| µg | | | | | | | | |
| 1. Ch. affine | 90 | 30 | — | — | 60 | 90 | 90 | 50 |
| 2. Ch. ampullare | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 3. Ch. angustispirale | 95 | 25 | 40 | — | 50 | 55 | 90 | 50 |
| 4. Ch. atrobrunneum | 60 | — | — | — | — | — | 40 | 30 |
| 5. Ch. atrosporum | 100 | 40 | — | — | 110 | 140 | 70 | 50 |
| 6. Ch. aureum | 150 | 110 | 30 | 20 | 65 | 170 | 150 | — |
| 7. Ch. brasiliensis | 60 | — | — | — | 60 | 110 | 210 | 60 |
| 8. Ch. bostrychodes | 140 | 75 | 30 | 30 | 40 | 60 | 950 | — |
| 9. Ch. circinatum | 390 | 160 | 60 | 90 | 160 | 210 | 70 | 40 |
| 10. Ch. cochliodes | 170 | 80 | — | — | 60 | 60 | 280 | 90 |
| 11. Ch. convolutum | 60 | 110 | 30 | — | 200 | 240 | 110 | 65 |
| 12. Ch. crispatum | 50 | 50 | 30 | — | 60 | 40 | 80 | 50 |
| 13. Ch. cristatum | 65 | 40 | — | — | 50 | 50 | 60 | — |
| 14. Ch. cuniculorum | 60 | — | 45 | — | 70 | 30 | 90 | 50 |
| 15. Ch. dolichotrichum | 355 | 340 | — | — | 250 | 200 | 140 | 90 |
| 16. Ch. elatum | 150 | 80 | — | — | 50 | 70 | 250 | 70 |
| 17. Ch. erectum | 100 | 70 | — | — | 210 | 120 | 80 | 80 |
| 18. Ch. formosum | 190 | 60 | — | — | 80 | 110 | 90 | 50 |
| 19. Ch. funicolum | 120 | 50 | 40 | — | 80 | 70 | 125 | 60 |
| Kontroll | 950 | — | 970 | — | 970 | — | 960 | — |

fenolanyag mennyiségeket, 7 naponként, U. V. abszorpciós méréssel elemeztük. A mineralizáció folyamán képződő átmeneti termékek — a megfelelő aromás karbonsavak — mennyiségét ugyancsak meghatároztuk. Az inkubáció különböző időpontjaiban kapott mérési eredményeket a 2. táblázatban ismertetjük.

A kvalitatív fenoloxidáz vizsgálatokat KÜSTER [16] lemezteszt eljárása alapján végeztük. E módszerrel a gombák lakkáz és tirozináz képzését vizsgáltuk meg. A fenoloxidáz próbát két lépésben folytattuk le. Először a mikro-szervezeteket agaros tápközegen, optimális pH viszonyok mellett, 25 °C-os termosztátban hét napon át előinkubáltunk. Az előinkubációt FÄHRÆUS [6] által ismertetett agaros közegen végeztük, mely élesztőkivonat nitrogénforrást és glükóz szénforrást tartalmazott. A tápközeg kémhatását 5,5-ös pH értékre állítottuk be. Az inkubáció befejeztével a gombák telepeiből 7 mm Ø agarlemez korongokat vágunk ki. Az agarlemez korongokat a specifikus szubsztrátumokat — hidrokinon, p-fenilén diamin, p-krezol, tirozin — 0,1%-os mennyiségben tartalmazó steril agarlemezekre helyeztük.

A fenolos közeg összetétele: Fenolanyag 1 g, KH_2PO_4 = 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,5 g, KCl = 0,5 g, agar 25 g, deszt. víz 1000 ml pH 4,6.

A lemezkorongok elhelyezése után a Petri-csészéket egy napra 24 °C-os termosztátba helyeztük a fenoloxidázok által kiváltott színreakció előhívása céljából, majd a lemezkorongok körül képződött színes gyűrű vastagságát mm-ekben lemértük. A vizsgálati adatokat a 3. táblázatban ismertetjük.

2. táblázat

Aromás ligninszármazékok lebontásának értékei az inkubáció különböző időszakaiban.
(Bevitt mennyiség 1000 µg/lombik)

| (1) A vizsgált gombatörzsek megnevezése és inkubá- ciós idő napokban | | (2) Vanillin | | (3) p-oxibenz- aldehid | | (4) Ferulasav | | (5) Szíringaldehid | |
|---|----|-------------------|------------------------------------|------------------------------|--|-------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| | | vissza- maradt | vanillin- sav képző- dött | vissza- maradt | p-oxi- benzoe- sav képző- dött | vissza- maradt | vanillin- sav képző- dött | vissza- maradt | Szíring- sav képző- dött |
| | | µg | | | | | | | |
| Kontroll | | 975 | — | 980 | — | 980 | — | 985 | — |
| Fusarium avenaceum (L-6) | 7 | — | 30 | — | — | 80 | 55 | 190 | 205 |
| Nigrospora sp. | | 180 | 75 | 65 | 30 | 299 | 240 | 410 | 270 |
| Fusarium avenaceum (L-6) | 14 | — | — | — | — | 30 | 40 | 70 | 100 |
| Nigrospora sp. | | 65 | 70 | — | — | 150 | 210 | 315 | 255 |
| Fusarium avenaceum (L-6) | 21 | — | — | — | — | — | 20 | 40 | 65 |
| Nigrospora sp. | | 40 | 55 | — | — | 70 | 170 | 240 | 230 |
| Fusarium avenaceum (L-6) | 28 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Nigrospora sp. | | — | 30 | — | — | 30 | 110 | 190 | 210 |
| Kontroll | | 960 | — | 960 | — | 970 | — | 980 | — |

A gombák fenoloxidáz képzésének mennyiségi viszonyait a környezeti viszonyok függvényében Warburg manometrikus módszerével vizsgáltuk. A vizsgálatok céljára a gombákat FÄHRÆUS [6] által leírt folyékony tápközegen tenyésztettük. Kísérleteinkben kétféle alaptápközeg alkalmaztunk: az egyik szervesetlen nitrogént — NH_4Cl -ot — tartalmazott, a másik tápközeg pedig élesztőkivonat nitrogénforrást. A folyékony tápközeg 150 ml-es Erlenmeyer lombikokba adagoltuk. Lombikokba 20–20 ml tápoldatot mérünk be. A sterilizálást autoklávban végeztük 0,7 atm. nyomáson 25 percig. A beoltás ugyanezen folyékony tápközegen előtenyésztett gombák homogenizált micélium szuszpenziójával történt. A gombákat 4 napig előinkubáltuk, majd a rázatás útján nyert micélium szuszpenzió 1–1 ml-ét átvittük tenyészlombikokba. A kísérletet 3 gombatörzsszel (L-6, L-12, tn-11) 6 ismétlésben állítottuk be, a két különböző tápközegen, négy kezeléssel.

A kísérlet variánsai:

- Élesztőkivonatot tartalmazó tápközeg
- Élesztőkivonatot tartalmazó tápközeg + 8-oxikinolin
- NH_4Cl —N-forrást tartalmazó tápközeg
- NH_4Cl —N-forrást tartalmazó tápközeg + 8-oxikinolin

Az inkubáció 25 °C-os termosztátban 7 napon át tartott. A lakkáz szintézisére serkentően ható anyagot, a 8-oxikinolint, az inkubáció negyedik napján adagoltuk a megfelelő variánsokhoz, olyan mennyiségben, hogy a koncentrációja $2 \cdot 10^{-4}$ M legyen a lombikokban.

Az inkubáció folyamán kolorimetrikus vizsgálattal ellenőriztük a polifenoloxidáz aktivitást. Hét napig tartó inkubáció után minden egyes kezelés 2–2 tenyészetéből micéliumsúly meghatározást végeztünk. Három-három

3. táblázat

Mikroszkópikus gombák fenoloxidáz reakciója mono- és difenollokkal szemben

| (1) A vizsgált Chaetomiumok | (2) A színes gyűrű vastagsága mm-ben | | | |
|--------------------------------|--|---------------------------|---------------|---------|
| | Hidro- kinon | p-Feni- lén- diamin | p-Kre- zol | Tirozin |
| 1. Ch. affine | 6 | 4 | — | — |
| 2. Ch. ampullare | 2 | + | — | — |
| 3. Ch. angustispirale | 4 | 3 | — | — |
| 4. Ch. atrobrunneum | + | + | 2 | + |
| 5. Ch. atrosporum | 5 | 3 | — | — |
| 6. Ch. aureum | 3 | 2 | 2 | + |
| 7. Ch. brasiliensis | 4 | 2 | 2 | + |
| 8. Ch. bostrychodes | — | — | — | — |
| 9. Ch. circinatum | — | — | — | — |
| 10. Ch. cochliodes | — | — | — | — |
| 11. Ch. convolutum | — | — | — | — |
| 12. Ch. crispatum | 7 | 3 | — | — |
| 13. Ch. cristatum | 7 | 4 | — | — |
| 14. Ch. cuniculorum | — | — | — | — |
| 15. Ch. dolichotrichum | 4 | + | — | — |
| 16. Ch. elatum | — | — | — | — |
| 17. Ch. erectum | 5 | 3 | 2 | + |
| 18. Ch. formosum | 4 | + | 3 | + |
| 19. Ch. funiculum | — | — | — | — |
| Kontroll | — | — | — | — |

tenyészetből pedig elkülönítettük az intra- és extracelluláris lakkáz produktumot. A miceliumsúly meghatározása oly módon történt, hogy a miceliomot szűrőssel elválasztottuk a tápoldattól és a szűrőtölesekben visszamaradt micelium anyagot hideg desztillált vízzel átmostuk és 100 °C-on súlyállandóságig szárítottuk, majd a száraz micelium súlyát analitikai mérlegen lemértük. Az inokulummal bevitt micelium súlyát a fentiekkel megegyező módon határoztuk meg — az oltás céljára felhasznált szuszpenzió azonos mennyiségéből — és a számításnál levontuk azt a tenyészeteknél nyert miceliumsúly értékekből. Így a lakkázaktivitás értékét nettó miceliumsúlyra vonatkoztatjuk. A lakkáz elkülönítését két szakaszban folytattuk le LINDBERG és HOLM [19] eljárása szerint. Először a tápoldatban levő extracelluláris lakkázt preparáltuk, majd a miceliumban intracellulárisan található lakkázt extraháltuk ki.

A lakkázokat a folyékony közegből $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -al történő telítéssel csaptuk ki, majd 6,8-as kémhatású foszfátpufferben a csapadékot feloldottuk és dializáltuk 12 h-ig csapvízben, majd újabb 12 órán át desztillált vízben. A dialízis után a lakkázaktivitást kolorimetrikus módszerrel ellenőriztük.

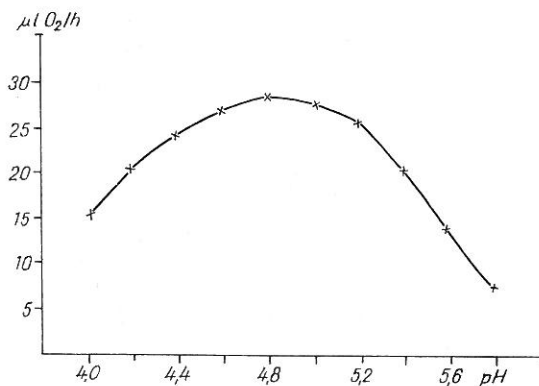
A dializált enzimmikrokonat polifenoloxidáz aktivitását Warburg manometrikus módszerrel vizsgáltuk. A Warburg edénykébe 1 ml pH 5-ös, 0,1 M-os nátriumacetát puffert és 1 ml kultúra dializátumot mértünk be. A centrális edénykébe 0,2 ml 10 %-os KOH oldatot, az oldalágba pedig 0,5 ml 0,1 M-os szubsztrátumot (fenololdatot) adagoltunk. A folyadék összterfoglata a Warburg edénykébe 2,7 ml volt. A manometrikus vizsgálatok során a hidrokinnon, a pirokatehin és a pirogallol oxidációját tanulmányoztuk. Az oxigén

felhasználás mértékét 26 °C-os hőmérsékleten vizsgáltuk. A manométerekkel összekapcsolt edénykéket a vízfürdő hőmérsékletének átvétele céljából 20 percig nyitott légszelepekkel járattuk. Majd a légszelepeket elzártuk és az edényke oldalágában levő szubsztrátumot egyesítettük az enzim kivonattal. A nyomáscsökkenést, illetve az oxigénfelhasználás mértékét 20 percenként olvastuk le. A különböző fenolanyagok oxidációjának intenzitását, a gombatörzsek lakkázaktivitásának értékét $\mu\text{l O}_2/\text{h}$ mennyiségekben a 4. táblázatban ismertetjük.

Vizsgálatokat végeztünk arra nézve is, milyen hatással van az oxidációs rendszer pH-ja a lakkázaktivításra. Az eltérő pH-viszonyokat 0,1 M-os nátriumacetát — ecetsav pufferrel biztosítottuk. A kísérlet céljára az L—6 gombatörzs fermentlevéből nyert lakkázdializátumot használtuk fel. A vizsgálat során a 0,1 M-os hidrokinon oldat oxidációját tanulmányoztuk. A kísérletet az előzőekben leírt körülmények között folytattuk le. A mérési eredményeket, azaz a hidrokinon oxidációjának intenzitását a pH viszonyok függvényében az 1. ábrán ismertetjük.

Az eredmények megbeszélése

A vizsgálati adatokból (1. táblázat) kielemezhető, hogy a tanulmányozott gombaszervezetek többsége részt vesz az aromás vegyületek biológiai átalakításának folyamataiban. Jól növekedtek az aromás ligninszármazékokon, bár eltérő mértékben hasznosították azokat szénforrás minőségében. Az oxi-



1. ábra

A hidrokinon oxidációja különböző pH viszonyok mellett.

dáció folyamán átmeneti oxidációs termékek is képződnek, amelyek bizonyos körülmények között felhalmozódnak, mivel az oxidációs lépcső következő fokozatai jóval kisebb intenzitással mennek végbe. A vizsgált vegyületek közül a p-oxibenzaldehid volt legkönnyebben megtámadható, míg a ferulasav és a vanillin jóval lassabban mineralizálódott. A sziringaldehid rendelkezett a legnagyobb ellenálló képességgel. A fentiek alapján teljes mértékben indokoltnak tekinthetjük HENDERSON [13], HENDERSON és FARMER [14] azon megállapítását, hogy az aromás ligninszármazékok elbontásának intenzitása szoros kapcsolatban van az aromás gyűrűhöz kapcsolt metoxi gyökök számával.

4. táblázat
Az L—6, L—12 és a tn-11 gombatörzsek extra és intracelluláris lakkázaktivitása.
($\mu\text{l O}_2/\text{h}$)

| (1) A gombatorzsek megnevezése és jelzése | (2) Kezelések | (3) Micé- limum súly mg | (4) Extracelluláris | | | | | | (5) Intracelluláris | | | |
|--|----------------------|---|--------------------------|--------------|-------------|--------------|------------|--------------|------------------------|--------------|--|--|
| | | | Hidrokinon | | Pirokatehin | | Pirogallol | | Hidrokinon | | | |
| | | | μl O ₂ /h pro | | | | | | | | | |
| | | | lombik | 1 mg mic. | lombik | 1 mg mic. | lombik | 1 mg mic. | lom- bik | 1 mg mic. | | |
| Fusarium avenaceum var. her- barum (L—6) | „A” közeg | 114 | 2850 | 26 | 2500 | 23 | 2280 | 21 | 230 | 3 | | |
| | „A” közeg + 8—o | 44 | 1360 | 31 | 1200 | 27 | 1010 | 23 | 220 | 5 | | |
| | „B” közeg | 99 | 200 | 2 | 200 | 2 | 150 | 1,5 | — | — | | |
| | „B” közeg + 8—o | 27 | 740 | 28 | 760 | 29 | 820 | 31 | 30 | 1 | | |
| Fusarium solani var. argillaceum (L—12) | „A” közeg | 191 | 1530 | 8 | 1340 | 7 | 1340 | 7 | 570 | 3 | | |
| | „A” közeg + 8—o | 202 | 1820 | 9 | 1000 | 5 | 2020 | 11 | 570 | 3 | | |
| | „B” közeg | 150 | 80 | 0,5 | 150 | 1 | — | — | 150 | 1 | | |
| | „B” közeg + 8—o | 112 | 1460 | 13 | 1130 | 11 | 1460 | 13 | 450 | 4 | | |
| Fusarium sp. (tn—11) | „A” közeg | 172 | 2580 | 15 | 2410 | 14 | 2230 | 13 | 520 | 3 | | |
| | „A” közeg + 8—o | 164 | 2620 | 16 | 2130 | 13 | 1800 | 11 | 500 | 3 | | |
| | „B” közeg | 106 | 110 | 1 | 110 | 1 | 110 | 1 | — | — | | |
| | „B” közeg + 8—o | 72 | 1510 | 21 | 1370 | 19 | 1370 | 19 | 70 | 1 | | |

Megjegyzés: az „A” közeg élesztőtkivonat N-forrást tartalmaz, a „B” közeg NH_4Cl N-forrást tartalmaz.

A p-oxibenzaldehid metoxi gyököt nem tartalmaz, a vanillinsav és a ferulasav egy-egy metoxi csoporttal rendelkezik, míg a sziringaldehid, amely leginkább ellenállónak bizonyult, két metoxi csoporttal rendelkezik. Az átmeneti oxidációs termékek közül a megfelelő aromás karbonsavakat határoztuk meg.

Így a p-oxibenzaldehid — p-oxibenzoesav, vanillin és ferulasav — vanillinsav, sziringaldehid — sziringasav voltak a kimutatott anyagok, illetve származékok. Az aromás karbonsav származékok közül a sziringasav és a vanillinsav sokkal lassabban bomlanak le, mint a megfelelő aldehidek. Ez azt eredményezi, hogy a kultúrközegben felhalmozódhatnak ellentétben a p-oxibenzoesavval, mely képződésének mértéke szerint többnyire azonnal tovább oxidálódik. Talajviszonyok között a fenoloxidázokat szintetizáló szervezetek tirozináz és lakkáz típusú fermentjeik révén a karbonsav származékokat difenolokká illetve kinonvegyületekké oxidálhatják. A kinonszármazékok pedig polimerizációs folyamatokban vehetnek részt, melynek eredményeképpen sötétszínű melanin típusú termékek képződnek. A KÜSTER módszerével lefolytatott fenoloxidáz-teszt vizsgálatok adatai azt mutatják, hogy a tanulmányozott gomba-

szervezetek többsége, sőt egyes sugárgombák is lakkáz típusú fermenteket szintetizálnak. Tirozináz aktivitás csak néhány esetben volt megfigyelhető (3. táblázat). A lakkáz aktivitás, valamint az aromás ligninszármazékok lebontásának mértéke között szoros kapcsolatot nem tapasztaltunk, bár a lakkáz képző szervezetek jól növekedtek az aromás vegyületet tartalmazó tápközegben, de számos olyan gomba szervezetről is elmondható ez, amely sem lakkáz, sem tirozináz nem képezett. Mindezek azt támasztják alá, hogy az aromás gyűrű felbontását katalizáló protokatehusav oxidázok és a kinontípusú oxidációt kiváltó lakkáz ferment — hatásmechanizmus, valamint fölépítés tekintetében — teljesen különbözik egymástól. FREUDENBERG [9] a ligninkémia elismert tekintélye, a lignin szintézisének és lebontásának folyamataiban egyaránt a lakkáznak tulajdonítja a legfontosabb szerepet. BURGESS [4], valamint HURST [15] óvatosan foglaltak állást a lakkáz szerepét illetően, hangsúlyozva azt, hogy nincs meggyőzően bizonyítva a lakkáz funkciója a lignin lebontásában. HENDERSON [12] rámutatott arra; egyedül a lakkázaktivitás alapján nem lehet megmagyarázni a ligninbontás folyamatait — így az aromás alapegységek felszabadítását sem — mivel a polifenoloxidázok az aromás vegyületek kinon típusú átalakulását eredményezik, a kinon vegyületek pedig polimerizációs folyamatokban vehetnek részt, ez pedig ellentétes irányú folyamat a mineralizációval.

A gombák fenoloxidáz képzésének mennyiségi viszonyait Warburg manometrikus módszerével vizsgáltuk (4. táblázat). A vizsgálatok adataiból kielemezhető, hogy a tanulmányozott gombák extra- és intracelluláris lakkáz tartalmaznak. Minthogy a lakkáz tipikus parapolifenoloxidáz, az enzimdiálizátumok a hidrokinon szubsztátum oxidációját katalizálták legintenzívebben. Az élesztőkivonat N-forrás serkentően hatott a gombák lakkázszintézisére. Ez kapcsolatban van azzal, hogy az élesztőkivonat jelenlétében a gombák intenzív micélium növekedésre képesek, ezenkívül az számos olyan aminosavat, fehérjét és vitamint tartalmaz, amelyek közreműködhetnek az enzimmolekula fölépítésében. A 8-oxikinolint tartalmazó tápközegen a micéliumsúly alatta maradt a 8-oxikinolint nem tartalmazó tenyészetek micéliumsúlyának. A 8-oxikinolinnak az NH_4Cl nitrogénforrást tartalmazó tápközegbe történő bevitele nagymértékben fokozta a gombák lakkáz aktivitását, míg az élesztő kivonat jelenlétében növekvő gombák lakkáz produkcióját alig vagy egyáltalán nem befolyásolta.

A vizsgálati eredmények alapján megállapítható, hogy a tanulmányozott gombaszervezetek többsége az aromás vegyületek biológiai átalakításában fontos szerepet játszik. Jelenleg folyamatban levő vizsgálataink eredményei arra mutatnak, hogy egyes gombatorzsek a 0,01% koncentrációban bevitt fenolanyagok túlnyomó részét már az inkubáció első hetében lebontják (2. táblázat). Így az L-6 gombatorzsz kultúrájában p-oxibenzaldehidet vagy származékát a p-oxibenzoesavat a beoltás után egy héttel már nem lehetett kimutatni. A vanillint és ferulasavat tartalmazó kultúrákban már csak vanillinsavat azaz az oxidáció folyamán keletkező átmeneti terméket lehetett kimutatni U. V. abszorpciós méréssel. A sziringaldehid esetében a közeg eredeti fenolaldehid tartalma 20%-ra csökkent. Az L-6, L-9 és *Nigrospora* sp. magas (0,05%) koncentrációjú fenolos közegen is jól növekedtek, s amennyiben kiegészítő glukóz szénforrást is tartalmazott a tápközeg, sötétszínű melanin-típusú anyagok képződtek. Fotometrikus mérési adatok arra mutatnak, hogy különösen jelentős mennyiségű melanin típusú anyag halmozódik fel

abban az esetben, ha élesztő kivonat N-forrást is tartalmaz a tápközeg. Ilyen körülmények kedveznek a gombák lakkáz szintézisére. Mindezek jól dokumentálják, hogy a környezeti faktorok az aromás ligninszármazékok transzformációját és e folyamatban részt vevő szervezetek tevékenységét jelentős mértékben meghatározzák.

Összefoglalás

A tanulmányozott mikroszkopikus gombák többsége egyedüli szénforrásként értékesítette a folyékony tápközegbe, alacsony koncentrációba bevitt lignin származékokat. A tanulmányozott aromás vegyületek: p-oxibenzaldehid, vanillin, ferulasav és sziringaldehid voltak.

A fenolaldehidek és a fenilpropánegység lebontása során aromás karbonsavak képződtek, mint átmeneti oxidációs termékek. Az U. V. abszorpciós mérések során p-oxibenzoesavat, vanillinsavat és sziringasavat identifikáltunk a tápközegben. A p-oxibenzoesav az esetek többségében azonnal tovább oxidálódik, míg a többi aromás karbonsav, de különösen a sziringasav lebontása sokkal lassabban megy végbe, mint a megfelelő aldehidek, illetve fenilpropánok oxidációja, így ezek a tápközegben főlhalmozódhatnak.

Küster lemezteszt módszerével megvizsgált 19 mikroszkopikus gomba közül 12 lakkáz típusú polifenoloxidázokat szintetizált. Tirozinázt csak 5 gombatorzsnél sikerült kimutatni.

A gombák lakkázproduktuma extra és intracelluláris enzim. A dializált enzimkivonatok — Warburg manometrikus módszerével lefolytatott vizsgálatok során — gyorsan oxidálták a difenolokat és a pirogallolt. A gombák lakkázszintézisét az élesztő kivonat nitrogénforrás, valamint a 8-oxikinolin — szervesetlen nitrogénforrás jelenlétében — serkentette.

Az aromás ligninszármazékok lebontása és a fenoloxidáz aktivitás között szoros kapcsolat nem mutatható ki.

Irodalom

- [1] BOLDIN, J.: Recherche de la tyrosinase et de la laccase chez les Basidiomycetes en culture pure. Milieux différentiels. Intérêt systématique. *Rev. Mycol.* **16**, 173—180. 1951.
- [2] BÖRNER, H.: Untersuchungen über phenolische Verbindungen aus Getreidestroh und Getreiderückständen. *Naturwissenschaften.* **42**, 583—584. 1955.
- [3] BÖRNER, H.: Der papierchromatographische Nachweis von Ferulasäure in wässrigen Extrakten von Getreidestroh und Getreiderückständen. *Naturwissenschaften.* **43**, 129. 1956.
- [4] BURGESS, N. A.: Enzymes associated with phenols. In *Enzyme chemistry of phenolic compounds*. Ed. PRIDHAM, J. B. Pergamon Press. London. 1963.
- [5] DAGLEY, S., EWANS, W. C. & RIBBONS, D. W.: New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Nature.* **183**, 560—568. 1960.
- [6] FÄHRRAEUS, G.: Formation of laccase by *Polyporus versicolor* in different culture media. *Phys. Plant.* **5**, 284—291. 1952.
- [7] FÄHRRAEUS, G.: Further studies in the formation of laccase by *Polyporus versicolor*. *Phys. Plant.* **7**, 704—712. 1954.
- [8] FÄHRRAEUS, G. & LJUNGGREN, H.: Substrate specificity of purified fungal laccase. *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 22—32. 1961.
- [9] FREUDENBERG, K.: Biosynthesis and constitution of lignin. *Nature.* **183**, 1152—1155. 1959.
- [10] HENDERSON, M. E. K.: Release of aromatic compounds from birch and spruce sawdusts during decomposition by white rot fungi. *Nature.* **175**, 634—635. 1955.

- [11] HENDERSON, M. E. K.: Study of the metabolism of phenolic compounds by soil fungi using spore suspensions. *J. Gen. Microbiol.* **14**, 684—691. 1956.
- [12] HENDERSON, M. E. K.: Studies on the physiology of lignin decomposition by soil fungi. In the *Ecology of Soil Fungi*. Ed. PARKINSON, D., & WAID, J. S. University Press. Liverpool. 1960.
- [13] HENDERSON, M. E. K.: The metabolism of aromatic compounds related to lignin by some hyphomycetes and yeast-like fungi of soil. *J. Gen. Microbiol.* **26**, 155—165. 1961.
- [14] HENDERSON, M. E. K. & FARMER V. C.: Utilization by soil fungi of p-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde, ferulic acid and vanillin. *J. Gen. Microbiol.* **12**, 37—46. 1955.
- [15] HURST, H. M.: Aromatic acid-reducing systems in fungi. In *Enzyme chemistry of phenolic compounds*. Ed. PRIDHAM, J. B. Pergamon Press. London. 1963.
- [16] KÜSTER, E.: Microbielle Polyphenoloxidasen und Humusbildung. *Zbl. Bakt. Teil I* **160**, 207—213. 1953.
- [17] KÜSTER, E.: Phenol oxidases in Streptomyces. In *Enzyme chemistry of phenolic compounds*. Ed. PRIDHAM, J. B. Pergamon Press. London. 1963.
- [18] LEMON, H. W.: The effect of alkali on the ultraviolet absorption spectra of hydroxyaldehydes, Hydroxyketones and other phenolic compounds. *J. Amer. chem. Soc.* **69**, 2998—3001. 1947.
- [19] LINDBERG, G. & HOLM, G.: Occurrence of tyrosinase and laccase in fruit bodies and mycelia of some Hymenomycetes. *Phys. Plant.* **5**, 100—114. 1952.
- [20] LYR, H.: Über die an der Ligninbildung beteiligten Fermentsysteme. *Naturwissenschaften*, **44**, 235. 1957.
- [21] SEVČEK, V.: The character of the phenol oxidase of the Actinomyces, Streptomyces antibioticus and the influence of surface active agents, the determination of its activity. *Folia Biol.* **3**, 212—217. 1957.
- [22] TROJANOWSKI, J. & MATWIJOW, J.: On the occurrence of laccase in the process of humification. *Roczniki gleboznawcze*, **14**, 45—50. 1964.
- [23] WIERINGA, K. T.: The humification of high-moor peat. II. Soil microorganisms decomposing aromatic compounds, and synthesis of complex humus-like substances. *Plant and Soil*, **21**, 233—344. 1964.

Érkezett: 1968. szeptember 18.

Investigation on the Biological Oxidation of Phenols and Aromatic Lignin Derivatives

F. GULYÁS

Research Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences,
Budapest

Summary

Investigations were conducted on the biological oxidation processes in the transformation of aromatic compounds to quinone types, as well as on those leading to the complete decomposition of aromatic lignin derivatives.

On the basis of the laboratory investigations, it was concluded that the majority of the studied microscopic fungi utilized lignin derivatives as the sole carbon source, added in low concentrations to the liquid media. These compounds were p-oxybenzaldehyde, vanillin, ferulic acid and syringaldehyde.

In the course of phenol aldehyde and phenylpropane units decomposition, aromatic carbon acids were formed as temporary oxidation products. During U. V. absorption measurements, p-oxybenzoic acid, vanillic acid, and syringic acid were determined in the media. In most cases p-oxybenzoic acid oxidized immediately, while the decomposition of the other aromatic carbonic acids, especially syringic acid, was accomplished much more slowly than the oxidation of aldehydes and phenyl propanes. These thus became accumulated in the medium. 12 microscopic fungi of the 19 studied with the Küster plate test method synthesized laccase type polyphenol oxidases. Tyrosinase could be demonstrated only in 5 fungi strains.

The fungous laccase is an extra- and intracellular ferment. In the course of investigations carried out with the Warburg manometric method, the dialized ferment extracts oxidized the diphenols and pyrogallol. The laccase synthesis of the fungi was stimulated by the presence of the yeast extract, N-source, as well as 8-oxyquinoline as an inorganic N-source.

A close relationship between the decomposition of the aromatic lignin derivatives and phenoloxidase activity, could not be demonstrated.

Table 1. Decomposition of aromatic lignin derivatives by microscopic fungi. Incubation time: 28 days. (The initial quantity was 1000 $\mu\text{g}/\text{flask}$) (1) The investigated Chaetomium strains. (2) Remaining vanillin and vanillic acid formed. (3) Remaining p-oxybenzaldehyde and p-oxybenzoic acid formed. (4) Remaining ferulic acid; and vanillic acid formed. (5) Remaining syringaldehyde and syringic acid formed.

Table 2. The values of the aromatic lignin derivatives' decomposition in the various periods of incubation. (The initial quantity was 1000 $\mu\text{g}/\text{flask}$) (1) Naming of the fungous strains investigated; incubation time in days. (2)–(5): see Table 1.

Table 3. The phenoloxidase reaction of the microscopic fungi against mono- and diphenols. Naming of the investigated organisms. Thickness of the colour ring in mm.

Table 4. The extra and intracellular laccase activity of the L-6, L-12 and tn-11 fungous strains. ($\mu\text{l O}_2/\text{hour}$). (1) Naming of the fungous strains. (2) Treatments: medium „A” contained yeast extract, medium „B” contained NH_4Cl -t 8-0 = 8-oxyquinoline. (3) Mycelium weight in mg. (4) Extracellular laccase activity (5) Intracellular laccase activity (calculated 1 mg/flask).

Figure 1. Oxidation of hydroquinone under different pH conditions.

Etude de l'oxydation biologique des phénols et des dérivés aromatiques de la lignine

F. GULYÁS

Institut de Recherches Pédologiques et Agrochimiques de l'Académie des Sciences de Hongrie, Budapest

Résumé

L'auteur a étudié les processus oxydants biologiques menant à la transformation du type quinonique et ceux menant à la décomposition complète des dérivés aromatiques de la lignine.

Au cours de ses essais l'auteur a pu établir que la plupart des champignons microscopiques a utilisé comme source du carbone les dérivés de la lignine présents en concentration faible dans le milieu nutritif liquide. Les composés aromatiques ont été: p-oxybenzaldehyde, vanilline, acide férulique et aldéhyde syringique.

Au cours de la décomposition des aldéhydes phénoliques et du phénylpropane, des acides aromatiques se sont formés comme produits intermédiaires d'oxydation. A l'examen à la lumière UV l'on a pu identifier dans le milieu nutritif l'acide p-oxybenzoïque et l'acide syringique. L'acide oxybenzoïque est oxydé immédiatement dans la plupart des cas, tandis que la décomposition des autres acides aromatiques, et surtout de l'acide syringique est beaucoup plus lente que l'oxydation des aldéhydes des phénylpropanes correspondantes, ainsi ils peuvent s'accumuler dans le milieu nutritif.

De 19 champignons microscopiques examinés selon le test lamellaire de Küster 12 ont synthétisé des polyphénoloxydases du type laccase. L'on n'a pas pu trouver du tyrosinase qu'avec 5 souches de champignons. La laccase produite par les champignons est un coenzyme extra- et intercellulaire. Les extraits des enzymes ont rapidement oxydé les diphenols et le pyrogallol dans les essais manométriques selon la méthode de Warburg. La synthèse de la laccase a été stimulée par l'azote de l'extrait de levure, et en présence de 8-oxyquinoline par l'azote minéral.

L'on n'a pas trouvé une corrélation étroite entre la décomposition des dérivés de la lignine et l'activité de la phénoloxydase.

Fig 1. Oxydation de l'hydroquinone à divers pH.

Изучение процессов биологического окисления фенолов и ароматических производных лигнина

Ф. ГУЯШ

Научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии А. Н. Венгрии, Будапешт

Резюме

Автор изучал процессы биологического окисления, ведущие к переобrazованию ароматических соединений типа хинона, а также к полному разложению ароматических производных лигнина.

На основании лабораторных исследований автор установил, что в основном большинство изучаемые микроскопические грибы используют как единственный источник углерода производные лигнина, внесенные в низких концентрациях в жидкую питательную среду. Изученные ароматические соединения были следующими: р-оксибензальдегид, ванилин, феруловая кислота и сирингальдегид.

В ходе разложения комплекса фенолальдегидов и фенилпропана образуются ароматические карбоновые кислоты, как переходные продукты окисления. При измерении ультра-фиолетовой адсорбции в питательной среде определили р-оксибензойную кислоту, ванилиновую и сиринговую кислоты. В большинстве случаев окисление р-оксибензойной кислоты сразу же протекает дальше, в то время как другие ароматические карбоновые кислоты, а особенно разложение сиринговой кислоты, проходит гораздо медленнее, чем окисление соответствующих альдегидов или фенилпропанов и, таким образом, они накапливаются в питательной среде.

Среди 19 микроскопических грибов, изученных методом пластинок Кюстера, 12 синтезировали лакказы типа полифенолоксидаз. Тиразин удалось обнаружить только у 5 штаммов микроскопических грибов.

Лакказным продуктом грибов является экстра- и интрацеллюлярный энзим. Диализированные энзимные вытяжки в ходе определений, проведенных монометрическим методом Варбурга, быстро окисляли дифенолы и пирогаллол. Синтезирование лакказ микроскопическими грибами ускорялось в присутствии дрожжевых вытяжек, как источника азота, а также 8-оксихинолина, как неорганического источника азота.

Не наблюдалось тесной связи между разложением ароматических производных лигнина и активностью фенолоксидазы.

Табл. 1. Разложение микроскопическими грибами ароматических производных лигнина. Время инкубации 28 дней. (Внесенное количество 1000 мкг/сосуд). (1) Изученные *Chaetomium*. (2) Оставшийся ванилин и образованная ванилиновая кислота. (3) Оставшаяся параоксибензальдегидная кислота и образованная параоксибензойная кислота. (4) Оставшаяся феруловая кислота и образованная ванилиновая кислота. (5) Оставшийся сирингальдегид и образованная сиринговая кислота.

Табл. 2. Данные по разложению ароматических производных лигнина в различные периоды времени, инкубации. (Внесенное количество 1000 мкг/сосуд). (1) Название изученных штаммов грибов и время инкубации в днях. (2) — (5) смотри в таблице 1.

Табл. 3. Фенолоксидазная реакция микроскопических грибов в отношении моно- и дифенолов. (1) Название изученных микроорганизмов. (2) Толщина цветного кольца в мм.

Табл. 4. Вне- и внутриклеточная лакказная активность штаммов грибов L—6, L—12 и tn—11 (мл O₂/час). (1) Название и обозначение штаммов грибов. (2) Варианты: А питательный субстрат содержит дрожжевые вытяжки, В питательный субстрат — NH₄Cl. 8—0 = 8—оксихинолин. (3) Вес мицелия в мг. (4) Внеклеточная лакказная активность. (5) Внутриклеточная лакказная активность (в пересчете на сосуд и на 1 г мицелия).

Рис. 7. Гидрохинонное окисление при различных значениях pH.